

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
8 mars 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/15799 A1

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: B01J 13/08, A61K 9/50
- (21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02376
- (22) Date de dépôt international: 25 août 2000 (25.08.2000)
- (25) Langue de dépôt: français
- (26) Langue de publication: français
- (30) Données relatives à la priorité:  
99/10854 27 août 1999 (27.08.1999) FR
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):  
MAINELAB [FR/FR]; 8, rue André Boquel, Parc Scien-  
tifique des Capucins, F-49100 Angers (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): BENOIT,  
Jean-Pierre [FR/FR]; 45, allée des Châtaigniers, F-49240  
Avrille (FR). RICHARD, Joël [FR/FR]; La Modtais  
- Blou, F-49160 Longue (FR). FOURNIER, Elvire  
[FR/FR]; 9, rue Jacques Granneau, F-49100 Angers (FR).  
LIU, Sonia [FR/FR]; 9 Grande Rue, F-02250 La Neuville  
Bosmont (FR).
- (81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée:  
— Avec rapport de recherche internationale.
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR ENCAPSULATING ACTIVE SUBSTANCES BY COACERVATION OF POLYMERS IN  
NON-CHLORINATED ORGANIC SOLVENT

(54) Titre: PROCEDE D'ENCAPSULATION DE MATIERES ACTIVES PAR COACERVATION DE POLYMERES EN SOL-  
VANT ORGANIQUE NON-CHLORE

(57) Abstract: The invention concerns a method for microencapsulation of an active principle by coacervation which consists in controlled desolvation or coacervation of a polymer dissolved in an organic solvent containing said active principle, said coacervation being induced by adding a non-solvent causing the polymer to be deposited at the surface of the active principle, and by hardening the polymer deposit by adding a hardening agent, said hardening being leading to the formation of a continuous film coating the active principle. The invention is characterised in that the solvent is selected among ethyl acetate, N-methylpyrrolidone, methylethylacetone and acetic acid. The non-solvent is advantageously an alcohol comprising two to five carbon atoms and the hardening agent being for instance selected among water, alcohols comprising four carbon atoms and mixtures thereof.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un procédé de microencapsulation d'un principe actif par coacervation qui consiste en la désolvatation ménagée ou coacervation d'un polymère dissous dans un solvant organique contenant ledit principe actif, ladite coacervation étant induite par addition d'un non-solvant et se traduisant par le dépôt du polymère à la surface du principe actif, et en le durcissement du dépôt de polymère par ajout d'un agent durcisseur, ledit durcissement se traduisant par la formation d'un film continu enrobant le principe actif, caractérisé en ce que le solvant est choisi parmi l'acétate d'éthyle, la N-méthylpyrrolidone, la méthylethylcétone et l'acide acétique. Le non-solvant est avantageusement un alcool comprenant deux à 5 atomes de carbone et l'agent durcisseur est par exemple choisi parmi l'eau, les alcools comprenant un à 4 atomes de carbone et leurs mélanges.

WO 01/15799 A1

**« Procédé d'encapsulation de matières actives par coacervation de polymères en solvant organique non-chloré »**

La présente invention concerne un procédé de microencapsulation d'un principe actif par coacervation, utilisé notamment pour préparer des formes galéniques à libération prolongée.

Les techniques de microencapsulation sont classiquement utilisées pour séparer des substances chimiques incompatibles, convertir des liquides en poudres, améliorer la biodisponibilité de principes actifs, masquer le goût ou l'odeur désagréable de certains composés et préparer des formes galéniques à libération prolongée.

Les formes galéniques à libération prolongée sont susceptibles d'être administrées par voie sous-cutanée ou intramusculaire, et de se retrouver directement dans le flux sanguin ou à proximité de l'organe à traiter si bien que les polymères biodégradables sont souvent choisis pour entrer dans leur composition.

Les systèmes à libération prolongée à base de polymères biodégradables peuvent être administrés par la voie parentérale, sans retrait par intervention chirurgicale, puisque les polymères biodégradables se transforment dans l'organisme en métabolites éliminés par les voies naturelles. Le principe actif est libéré, suivant une cinétique modulée par la diffusion du principe actif et le processus de dégradation du polymère. De plus, l'observance du patient est améliorée du fait d'une administration moins fréquente.

Parmi les polymères biodégradables d'emploi fréquent dans l'encapsulation de principes actifs figurent les poly( $\alpha$ -hydroxy-acides), notamment les polymères d'acide lactique (PLA) et les polymères d'acides lactique et glycolique (PLAGA), la poly- $\epsilon$ -caprolactone, les polyorthoesters comme Chronomer<sup>®</sup> et Alzamer<sup>®</sup>, les polyanhydrides, notamment le copolymère d'acide sébacique et de (carboxyphénoxy)propane, les polypeptides et les polymères naturels biodégradables, comme l'albumine, la sérum albumine bovine, le collagène et le chitosane.

Il existe deux grands types de techniques de microencapsulation :

- les techniques sans solvant, comme le spray-congealing, l'extrusion (coextrusion/sphéronisation), la gélification, le prilling et la précipitation de solutions supercritiques (RESS), et
- les techniques avec solvants, comme la nébulisation, la coacervation, l'émulsion-évaporation, l'émulsion-extraction, avec leurs variantes à partir d'émulsions doubles eau/huile/eau.

Le contact prolongé des formes galéniques à libération prolongée avec un milieu aqueux justifie l'emploi de polymères à caractère plus ou moins hydrophobe, donc principalement solubles dans un milieu organique. Les polymères biodégradables à la base de systèmes à libération contrôlée sont cependant faiblement solubles dans les solvants de faible toxicité potentielle (solvants de classe 3 selon la norme ICH).

C'est pourquoi, les techniques classiques de microencapsulation (coacervation, émulsion-évaporation) emploient essentiellement des solvants chlorés comme le dichlorométhane (solvant de classe 2 selon la norme ICH, i.e. solvant à limiter) comme solvant du polymère. Or c'est un solvant chloré connu pour sa neurotoxicité. Le taux résiduel de dichlorométhane autorisé dans le produit fini est de 600 ppm selon la norme ICH4.

Quelle que soit la technique de microencapsulation employée, les microparticules obtenues renferment des quantités de solvants résiduelles. Il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles méthodes de microencapsulation ne faisant pas appel aux solvants chlorés. Deux solutions majeures se présentent pour résoudre ce problème.

Une solution permettant de réaliser l'encapsulation sans solvants chlorés repose sur des méthodes ne mettant en œuvre aucun solvant, mais certains polymères ne peuvent pas être mis en œuvre selon ces méthodes. En outre, les propriétés des particules obtenues par ces méthodes ne correspondent pas forcément aux exigences d'un traitement à long terme.

Une autre solution consiste à substituer les solvants chlorés par des solvants non toxiques. Les méthodes de microencapsulation qui utilisent des solvants chlorés ont été largement étudiées et les facteurs de variation sont connus. Cependant, la substitution des solvants chlorés par des solvants non chlorés modifie les interactions physico-chimiques entre les différents composants de la formulation. Le comportement des polymères biodégradables

dans les solvants de substitution est très différent de celui dans les solvants chlorés. Ainsi, le poly(L-lactide) et le poly(D,L-lactide) sont insolubles dans l'acétate d'éthyle ou l'acétone et aucun polymère n'est soluble dans l'alcool éthylique, qui est pourtant un solvant de prédilection puisqu'il est faiblement  
5 toxique.

La présente invention propose un procédé de microencapsulation par coacervation qui n'utilise aucun solvant chloré. Plus précisément l'invention concerne un procédé de coacervation par ajout de non-solvant. La coacervation par ajout de non-solvant requiert l'usage de trois solvants miscibles ; un de ces  
10 trois solvants est solvant du polymère et les deux autres sont non-solvants du polymère.

Le principe de la coacervation repose sur la désolvatation ménagée d'un polymère dissous dans un solvant organique contenant un principe actif généralement sous forme particulaire, induit par addition d'un non-solvant ou  
15 agent de coacervation du polymère. La solubilité du polymère dans le solvant organique est abaissée et il se forme deux phases non miscibles : le coacervat se dépose progressivement à la surface du principe actif. L'ajout d'un durcisseur permet la formation d'un film continu de polymère autour du principe actif.

Les particules de principe actif peuvent être liquides ou solides. Le  
20 principe actif peut également être initialement dissous dans le solvant du polymère. Il reprécipite alors sous forme particulaire lorsque l'on ajoute l'agent de coacervation, ou peut former une solution solide homogène dans les particules de polymère issues de la coacervation.

L'étude des interactions polymère/solvant/agent de coacervation, pour  
25 chaque association, permet de réaliser un diagramme de phases de façon à définir le rapport idéal polymère/solvant/agent de coacervation nécessaire à une encapsulation efficace. Cependant, il est difficile de prédire l'encapsulation d'un principe actif, car les propriétés interfaciales, en rapport avec les interactions moléculaires entre le polymère, le solvant et l'agent de coacervation, changent  
30 constamment avec la composition du coacervat (Thomassin C., Merkle H.P., Gander B.A., Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyester by coacervation, Int. J. Pharm, 1997, 147, 173-186).

Le problème majeur de la technique de coacervation est l'agglomération possible de particules. Pour tenter de le résoudre, des auteurs ont proposé de

réduire la température du système, essentiellement à l'étape de durcissement. Les parois sont alors suffisamment solides pour éviter l'adhésion. Des solutions telles que l'emploi de chloro-fluoro-carbones (CFC) ou l'abaissement de la température ne sont pas transposables à l'échelle industrielle. En revanche,  
5 l'emploi d'huile de silicone est capable de stabiliser le système grâce, à sa viscosité (Ruiz J.M., Tissier B., Benoit J.P., Microencapsulation of peptide : a study of the phase separation of poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)copolymers 50/50 by silicone oil, Int. J. Pharm., 1989, 49, 69-77).

La technique de coacervation, malgré des taux élevés de solvants  
10 résiduels reste une technique de choix pour l'encapsulation de principes actifs fragiles, et surtout de principes actifs hydrosolubles, en milieu non aqueux.

Le choix des associations solvant/agent de coacervation/durcisseur est guidé par divers critères :

- le solvant doit solubiliser le polymère ; on préfère qu'il ne solubilise pas le  
15 principe actif, bien que le procédé reste toujours utilisable avec un principe actif soluble dans le solvant du polymère.
- l'agent de coacervation doit être miscible au solvant du polymère. Il ne doit pas être solvant du polymère, car sinon cela reviendrait à un simple transfert du polymère du solvant vers l'agent de coacervation. De plus, il ne doit pas  
20 solubiliser le principe actif pour limiter les pertes d'encapsulation.
- le durcisseur doit être partiellement miscible au solvant du polymère pour en faciliter l'extraction. Il ne doit solubiliser, ni le polymère, ni le principe actif, car sinon le rendement d'encapsulation serait fortement diminué.

Dans l'art antérieur, la technique de coacervation fait appel au  
25 dichlorométhane ou au chloroforme comme solvant du polymère, à une huile silicone comme agent de coacervation, et à l'heptane comme durcisseur.

La présente invention concerne un procédé de microencapsulation d'un principe actif par coacervation qui consiste en

- la désolvatation ménagée ou coacervation d'un polymère dissous dans un  
30 solvant organique contenant ledit principe actif, ladite coacervation étant induite par addition d'un non-solvant et se traduisant par le dépôt du polymère à la surface dudit principe actif, puis

- le durcissement du dépôt de polymère par ajout d'un agent durcisseur, ledit durcissement se traduisant par la formation d'un film continu enrobant ledit principe actif, caractérisé en ce que
- 5 - le solvant du polymère est un solvant organique non chloré de point d'ébullition compris entre 30°C et 240 °C et de permittivité diélectrique relative et comprise entre 4 et 60, avantageusement choisi parmi l'acétate d'éthyle, la N-méthylpyrrolidone, la méthyléthylcétone, l'acide acétique, le propylène carbonate et leurs mélanges,
- 10 - le non-solvant est un alcool ou une cétone comprenant 2 à 5 atomes, et préférentiellement 2 ou 3 atomes de carbone, en particulier l'éthanol ( $\epsilon=24$ ), le propan-2-ol ( $\epsilon=18$ ), le propane-1,2-diol ( $\epsilon$  entre 18 et 24) et le glycérol ( $\epsilon=40$ ), ou la méthyléthylcétone ( $\epsilon=18$ ),
- l'agent durcisseur est choisi parmi l'eau, les alcools comprenant 1 à 4 atomes
- 15 de carbone à condition que l'agent durcisseur soit un alcool différent du non-solvant, et leurs mélanges.

Bien que la N-méthylpyrrolidone soit de classe 2 comme le dichlorométhane, sa concentration limite est nettement plus élevée (4840 ppm contre 600 ppm pour le dichlorométhane).

- 20 De façon avantageuse, le non-solvant et le durcisseur sont respectivement choisis parmi les couples suivants : propane-1,2-diol et propan-2-ol, glycérol et propane-1,2-diol, glycérol et propan-2-ol, propan-2-ol et propane-1,2-diol.

- 25 Selon un mode de réalisation préféré, le polymère est un polymère biodégradable dont la masse moléculaire en poids ( $M_w$ ) est comprise entre 10 000 et 90 000 g/mole, de préférence entre 15 000 et 50 000 g/mole, dont l'indice de polydispersité ( $I_p$ ) est comprise entre 1 et 3,5, de préférence entre 1,5 et 2,5.

- On indiquera ci-après un certain nombre d'autres caractéristiques additionnelles pour illustrer divers modes de mises en œuvre préférentielles de
- 30 l'invention.

Selon ces caractéristiques additionnelles, le polymère est un polymère d'acide lactique (PLA) ou un copolymère d'acides lactique et glycolique (PLAGA).

Le polymère est un PLAGA tel que  $M_w$  est comprise entre 15 000 et 20 000 g/mole, de préférence égal à 17 500,  $I_p$  est compris entre 1 et 2, de

préférence égal à 1,6, et le pourcentage d'acide glycolique est inférieur à 30%, de préférence égal à 25%.

La concentration en polymère dans le solvant est comprise entre 1 et 10% (p/v), de préférence de l'ordre de 4% (p/v).

5 Le rapport volumique non-solvant/solvant est compris entre 1/2 et 1/1.

La température de coacervation est inférieure à la température de transition vitreuse du polymère, de préférence inférieure ou égale à 25°C, de préférence inférieure à 4°C, de préférence encore inférieure ou égale à -4°C.

Le non-solvant est ajouté par doses successives de 200 µl à 1 ml.

10 La coacervation est réalisée sous agitation, par exemple sous agitation magnétique, à une vitesse comprise entre 200 et 1000 t/min.

L'agent durcisseur contient en outre un agent tensioactif, la concentration dudit agent tensioactif dans l'agent durcisseur étant comprise entre 0,5 et 10% (v/v).

15 L'agent tensioactif est un ester de sorbitan, par exemple le Tween<sup>®</sup> 80, ou l'alcool polyvinylique.

Le rapport volumique agent durcisseur/solvant est compris entre 5/1 et 180/1, et de préférence entre 15/1 et 120/1.

20 Le durcissement des microsphères est réalisé sous agitation, par exemple magnétique à une vitesse comprise entre 500 et 1500 t/min.

La température de durcissement est inférieure ou égale à 25°C, de préférence inférieure à 4°C, de préférence encore inférieure ou égale à 0,5°C.

Le durcisseur est ajouté en plusieurs fois, de préférence en quatre fois au minimum.

25 Le durcissement dure entre 2 et 4 heures.

Les microparticules obtenues à la suite du durcissement sont filtrées sur système Millipore<sup>®</sup>, par centrifugation ou sur papier plissé.

30 Lorsque le principe actif forme une dispersion dans la solution de polymère, le solvant et le non-solvant ont une viscosité suffisamment élevée pour stabiliser le principe actif.

La granulométrie du principe actif est comprise entre 1 et 50 microns, et préférentiellement entre 5 µm et 30 µm.

Selon un mode de réalisation préféré, le solvant est la N-méthylpyrrolidone, le non-solvant est l'éthanol, et le durcisseur est l'eau.

Selon un autre mode de réalisation préféré, le solvant est l'acétate d'éthyle, le non-solvant est le propan-2-ol, et le durcisseur est l'eau. Le polymère est un PLAGA 75 :25 tel que Mw est comprise entre 15 000 et 20 000, de préférence égal à 17 500, Ip est compris entre 1 et 2, de préférence égal à 1,6.

5 Selon un troisième mode préféré de réalisation, le solvant est l'acide acétique, le durcisseur est l'eau, et le polymère est un PLAGA 50 :50.

Dans le cadre de la présente invention, lorsque le principe actif est insoluble dans le solvant du polymère, on réalise soit une suspension, soit une émulsion.

10 Pour préparer la suspension, le principe actif est broyé au mortier puis mis en suspension dans le solvant. La suspension peut être homogénéisée sous agitation magnétique : la coacervation est alors aussi réalisée sous agitation magnétique. La suspension peut également être homogénéisée sous agitation mécanique, à vitesse variable (agitateur à hélice, Heidolph RGL500, Prolabo,  
15 Paris, France) ou à l'aide d'un Ultra-Turrax® T25 (Prolabo, Paris, France). Dans ces deux derniers cas, la coacervation est alors réalisée sous agitation mécanique.

La dispersion du principe actif dans la solution de polymère peut également être classiquement réalisée sous agitation par ultrasons.

20 Lorsque le principe actif est hydrosoluble, pour préparer l'émulsion, le principe actif est dissous dans l'eau, puis une émulsion eau/solvant du polymère est réalisée sous agitation mécanique. La coacervation se fait ensuite sous agitation mécanique.

Lorsque le principe actif est soluble dans le solvant du polymère, la  
25 coacervation est réalisée sous agitation mécanique.

Dans le cadre de la présente invention, le polymère est un polymère biodégradable d'emploi fréquent dans l'encapsulation de principes actifs, de préférence un PLA ou un PLAGA, de préférence encore un PLAGA de masse molaire en poids (Mw) comprise entre 10 000 et 90 000, de masse molaire en  
30 nombre (Mn) comprise entre 4 000 et 40 000, d'indice de polydispersité (Ip) compris entre 1 et 3,5, et dont la proportion de glycolide est comprise entre 10 et 60 %. On préférera les polymères de masse molaire en poids élevée supérieure ou égale à 15000 g/mole car ils permettent d'augmenter le rendement de fabrication en augmentant le volume de la phase de coacervat. On préférera

également les polymères dont l'indice de polydispersité est faible ( $I_p \leq 2,6$ ), car les fractions de bas poids moléculaire restent en solution et entraînent une baisse de rendement, ou provoquent l'agglomération des microparticules en se collant à leur surface.

- 5 Le PLAGA est par exemple le Resomer<sup>®</sup> RG 502 (Boehringer Ingelheim,  $M_w=14\ 300$  g/mole),  $M_n\ 6\ 900$  g/mole,  $I_p\ 2,5$ , 50 % de glycolide), le Resomer<sup>®</sup> RG 756 ( $M_w\ 89\ 800$  g/mole,  $M_n=35\ 200$  g/mole,  $I_p\ 2,6$ , 25 % de glycolide), le Resomer<sup>®</sup> RG 858 ( $M_w=87\ 000$  g/mole,  $M_n=22\ 000$  g/mole,  $I_p\ 3,9$ , 15 % de glycolide), le Phusiline fourni par Phusis ( $M_w=17\ 500$  g/mole,  $M_n=10\ 940$  g/mole,  $I_p=1,6$ , 25 % de glycolide).

La concentration en polymère dans le solvant doit être suffisante pour augmenter la viscosité du milieu, ce qui permet de stabiliser les gouttelettes de coacervat dispersées et de limiter leur agrégation, d'une part, et de diminuer la formation de microparticules de petite taille, d'autre part.

- 15 La concentration en polymère est de préférence comprise entre 1 et 10 % (p/v), de préférence encore égale à environ 4 % (p/v).

Les viscosités du solvant et du non-solvant doivent être suffisantes pour stabiliser les gouttelettes de coacervat.

- 20 Le volume de non-solvant à ajouter est défini de manière à porter le système dans la fenêtre de stabilité et obtenir un coacervat stable. Cependant, le volume de non-solvant dépend également de la concentration des cristaux de principe actif en suspension dans la solution organique de polymère.

- 25 L'addition d'un excès de non-solvant permet d'accélérer le durcissement de la paroi des microparticules, de prévenir leur agglomération et d'améliorer l'extraction du solvant.

- 30 La vitesse d'addition du non-solvant est suffisamment basse pour éviter la formation d'un grand nombre de microparticules trop petites, i.e. de taille comprise entre 1 et 2  $\mu m$ . En outre, plus la séparation de phase est lente, plus la distribution granulométrique des microparticules est uniforme et plus la surface des microparticules est lisse. L'ajout de non-solvant se fait de préférence graduellement par doses de 200  $\mu l$  à 1 ml, en observant au moins une minute entre chaque dose.

Une diminution de la vitesse d'agitation pendant l'étape de coacervation augmente la taille des gouttelettes de coacervat puis des microparticules finales.

Mais en dessous d'une vitesse limite, variable en fonction des systèmes, la cinétique de dépôt du coacervat est trop lente et/ou les gouttelettes de coacervat sont trop grosses et ne sont pas assez stables. Une agitation mécanique ou magnétique comprise entre 200 t/min et 1000 t/min donne souvent de bons résultats.

La température est le paramètre essentiel de la coacervation ; elle doit être inférieure à la température de transition vitreuse du polymère. Plus elle est basse, plus le milieu est visqueux et moins les microparticules ont tendance à s'agréger.

Le durcisseur idéal ne doit solubiliser ni le principe actif, ni le polymère. Il doit extraire facilement le solvant du polymère. Le durcisseur employé est de l'eau éventuellement additionnée de tensioactif ou d'un alcool. L'eau permet avantageusement d'extraire facilement le solvant du polymère. Elle présente, en outre, l'avantage d'être de faible coût, de ne pas nécessiter de retraitement des effluents. Cependant, l'eau n'est pas le durcisseur idéal, dans le cas de principes actifs hydrosolubles car tout contact prolongé est responsable de la diffusion du principe actif qui se traduit par un faible taux d'encapsulation.

Lorsque le principe actif encapsulé est hydrophile pendant le durcissement, il est rapidement dissous par l'eau qui pénètre dans les microparticules, et peut diffuser en retour hors des particules. En travaillant à basse température, on diminue les phénomènes de diffusion, donc les fuites de principe actif vers la phase aqueuse, et on améliore le rendement d'encapsulation.

D'autres possibilités peuvent être envisagées pour réduire la diffusion du principe actif ; comme la saturation de la phase externe par un électrolyte ou le principe actif lui-même, s'il est de faible coût, et l'association de l'eau à un autre solvant, qui présente une forte affinité pour le solvant du polymère afin de l'extraire des microsphères. Ainsi, on réduit le volume d'eau employé et le contact avec l'eau est atténué.

Le tensioactif ou l'alcool permettent de limiter l'agrégation des microparticules entre elles afin de former une dispersion homogène. Ils ont été sélectionnés en fonction de leur innocuité. Les tensioactifs sont choisis parmi ceux fréquemment utilisés dans les formulations destinées à la voie injectable

tels que les esters de sobitan polyoxyéthylénés, comme le Tween<sup>®</sup> 80 et le Tween<sup>®</sup> 20 (tensioactifs hydrophiles).

Le Montanox<sup>®</sup> 80 (monooléate de sorbitan polyoxyéthyléné) est un émulsifiant hydrophile, qui peut entrer dans la composition d'une émulsion de type Huile/Eau.

Le Montane<sup>®</sup> 80 (oléate de sorbitane) est son équivalent dans la gamme des tensioactifs lipophiles. Le Solutol<sup>®</sup> HS 15 (hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660) est un tensioactif non ionique, à caractère hydrophile utilisé dans les solutions injectables.

Le Synperonic<sup>®</sup> PE/F 68 (Poloxamer 188) est un copolymère-bloc de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène.

Enfin, l'alcool polyvinylique, a été employé sous deux grades différents : le Mowiol<sup>®</sup> 4/88 et le Rhodoviol<sup>®</sup> 4/125.

Le volume de durcisseur relève d'un compromis. Il doit être suffisant pour éliminer rapidement le solvant des microsphères, mais il devra limiter la diffusion du principe actif hors des microsphères. Le volume est défini d'après les critères de solubilité du solvant dans la phase externe, de manière à ce que la concentration finale du solvant dans le durcisseur soit inférieure à la concentration à saturation de la phase externe en solvant. En éliminant rapidement le solvant, la diffusion du principe actif est empêchée par la formation d'une barrière de polymère. De plus, les microsphères seront durcies ce qui évite l'agrégation.

L'augmentation du volume du durcisseur, faite de façon progressive par ajouts à intervalles réguliers, permet de mieux extraire le solvant des microparticules.

Le rapport du volume du durcisseur au volume du solvant est compris entre 5/1 et 180/1, et de préférence entre 15/1 et 120/1.

Les associations utilisant l'acide acétique ou la N-méthylpyrrolidone comme solvant du polymère nécessitent peu d'agent durcisseur pour donner des microsphères solides, si bien que le rapport du volume du durcisseur au volume du solvant est avantageusement de l'ordre de 5/1 dans ce cas.

La méthode de séchage des microparticules est fonction de la rigidité des microsphères, de la taille et des volumes à traiter.

La tendance des microparticules à s'agréger après séchage dépend de leur taux d'hydratation et des quantités de solvant résiduelles.

Si un séchage à l'air libre est insuffisant, la mise sous vide et/ou l'augmentation de la température permettent de la compléter, à condition que les microparticules soient résistantes au vide. Il faut cependant s'assurer que la vitesse et la température de séchage ne soient pas trop élevées pour éviter l'agglomération des microparticules.

Dans le cas des associations utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant du polymère, se pose le problème du choix de la méthode de séparation des microsphères. En effet, les microsphères sont encore gorgées de solvant après une agitation d'une heure dans le durcisseur. Une filtration sur un système Millipore®, à travers un filtre de porosité 0,5 µm donne lieu à un gâteau solide difficilement redispersable. De plus, le filtre est très vite colmaté par les microsphères encore déformables. La séparation par centrifugation sur un aliquot de la solution n'a pas donné le résultat espéré. Là encore, les microsphères s'agrégent et forment un culot, non redispersable, même à une vitesse de centrifugation peu élevée. Une autre technique de filtration utilisant un filtre en papier plissé, s'avère être une solution. Ce procédé présente l'avantage d'une surface de filtration importante et se réalise à pression atmosphérique. Cependant, les microsphères les plus petites ont tendance également à s'adsorber dans les pores et colmatent le filtre au fur et à mesure. Il est également difficile de récupérer la totalité des microsphères. Quant au séchage, il est assuré par un courant d'air comprimé, puis les microsphères sont laissées à l'air ambiant.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le solvant du polymère est l'acétate d'éthyle, le non-solvant est le propan-2-ol, et le durcisseur est un mélange eau/tensioactif, éventuellement un mélange eau/tensioactif/alcool.

Dans ce mode de réalisation, le polymère est de préférence un PLAGA 75 : 25. La concentration en polymère est comprise entre 1 et 5 % (p/v), de préférence égale à environ 4 % (p/v). La coacervation est menée à température ambiante, de préférence à une température inférieure à 4°C, de préférence encore inférieure à égale à - 4°C, sous agitation mécanique, de préférence à 300 t/min.

La concentration en tensioactif est comprise entre 1 et 10 % (v/v). Le tensioactif est le Tween<sup>®</sup> 80. Lorsqu'un alcool est associé à de l'eau, on fixe la concentration en tensioactif entre 1 et 10 % environ et la concentration en alcool entre 2,5 et 5 % environ. L'alcool est avantageusement le propan-2-ol ou le propane-1,2-diol. La solution aqueuse de durcisseur est ajoutée en au moins quatre fois. Le durcissement dure au moins 2h30 et au plus 4 heures, il est effectué à température ambiante, de préférence à une température inférieure à 4°C, de préférence encore à 0,5°C, sous agitation mécanique (500 t/min).

Le rapport volumique non-solvant /solvant est égal à 1/2.

10 Le rapport volumique durcisseur/solvant est égal à 120/1.

Plus la température de durcissement est basse, plus la durée de durcissement sera diminuée. Ainsi, lorsque la température est inférieure à 4°C, une durée de 4 heures suffit. La durée est abaissée à 2h30 quand la température est de 0,5°C.

15 Selon un autre mode de réalisation, le solvant est la N-méthylpyrrolidone, le non-solvant est l'éthanol et le durcisseur est un mélange eau/tensioactif. La concentration en polymère est comprise entre 4 et 10 % (p/v). La coacervation et le durcissement sont conduits à température ambiante, sous agitation magnétique. La concentration en tensioactif est comprise entre 0,5 et 10 % (v/v).  
20 La durée de durcissement est comprise entre 2 et 4 heures. Le rapport volumique durcisseur/solvant est égal à 40/1. Le polymère est de préférence le Résomer RG<sup>®</sup> 502 ou le résomer RG<sup>®</sup> 756.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants sans en limiter la portée.

25

**Exemple 1 : Evaluation des associations polymère/solvant/agent de coacervation/durcisseur.**

Dans cette étude, les poly( $\alpha$ -hydroxy-acides) ont été évalués. Trois copolymères d'acide lactique et glycolique, dont les proportions de L-, D-lactides et glycolides sont variables, ont été employés. Il s'agit des polymères suivants, fournis par Boehringer Ingelheim :

- le Resomer<sup>®</sup> RG 502 (Mw=14300g/mole, Mn=6900g/mole), qui comporte 25 % de L-lactide, 25 % de D-lactide et 50 % de glycolide,

- le Resomer<sup>®</sup> RG 756 (Mw=89800g/mole, Mn=35200g/mole), qui renferme 37,5 % de L-lactide, 37,5 % de D-lactide et 25 % de glycolide,
- le Resomer<sup>®</sup> RG 858 (Mw=87000 g/mole, Mn=22000 g/mole), qui possède 42,5 % de L-lactide, 42,5 % de D-lactide et 15 % de glycolide.

5        Au vu des solvants respectifs des polymères, les solvants les moins toxiques ont été sélectionnés. Ils appartiennent aux solvants de classe 2 ou 3, définis par la classification des lignes directrices de l'ICH.

La miscibilité des couples solvant/non-solvant des trois polymères étudiés a été ensuite déterminée. De la même manière, les non-solvants des polymères  
10        ont été choisis pour leur faible toxicité.

Le criblage des associations solvant/non-solvant/durcisseur est réalisé dans des flacons à scintillation, sur de faibles volumes de solutions organiques de polymères à 1 ou 4 (pour la N-méthylpyrrolidone et le PLAGA 50 : 50 exclusivement) % (m/v), 5 ml de solution organique de polymère sont placés  
15        dans un flacon à scintillation. On ajoute ensuite l'agent de coacervation jusqu'à obtenir un trouble, persistant à l'agitation, qui est caractéristique de la formation de coacervat. Le coacervat est observé à cette étape en microscopie optique. Puis 1 ml de ce mélange est versé dans 10 ml d'une solution aqueuse de tensioactif. On observe par microscopie optique la présence ou non de  
20        microsphères.

#### a) Essais de coacervation avec le PLAGA 50 : 50 (Resomer<sup>®</sup> RG 502)

Les solvants dans lesquels le PLAGA 50 : 50 est soluble sont l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'acétonitrile, l'acide acétique, le diméthylacétamide, le  
25        diméthylformamide, le lactate d'éthyle, la N-méthylpyrrolidone et le propylène carbonate. Le PLAGA 50 : 50 est insoluble dans le toluène, le propan-2-ol, le glycérol, le dioctyladipate, le propane-1,2-diol, le xylène, le diéthylcarbonate et la méthyléthylcétone.

30        Les associations pour lesquelles on observe la formation d'un coacervat et de microsphères sont les suivants :

- acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau + Tween<sup>®</sup> 80,
- acide acétique/propane-1,2-diol ou propan-2-ol /eau + Tween<sup>®</sup> 80,
- N-méthylpyrrolidone/éthanol/eau + Tween<sup>®</sup> 80 ou propan-2-ol,

- N-méthylpyrrolidone/méthyléthylcétone ou propan-2-ol/eau + Tween®80.
- Propylène carbonate/propan-2-ol/ eau éventuellement avec Tween® 80, éthanol ou NaCl.

L'acide acétique peut être employé comme solvant du polymère et donner lieu à la formation de coacervat et de microsphères bien individualisées, à condition d'utiliser l'eau comme durcisseur. Effectivement, il se forme des gouttelettes de coacervat dans l'association, acide acétique/propan-2-ol mais en présence de méthyléthylcétone ou propane-1,2-diol comme durcisseurs, les gouttelettes de coacervat ne conservent pas leur forme sphérique et il se forme des amas de polymères.

L'association acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau + Tween® 80 donne de bons résultats ainsi que l'association N-méthylpyrrolidone/éthanol/eau + Tween® 80. Cette étude a été complétée par la recherche de durcisseurs. Le propane-1,2-diol et le propan-2-ol s'avèrent être de bons candidats. Cependant, on peut noter une capacité d'extraction du solvant moindre avec le propane-1,2-diol qu'en présence de propan-2-ol.

Le propylène carbonate est un solvant intéressant par sa faible toxicité mais aussi par sa solubilité partielle dans l'eau. L'association propylène carbonate/propan-2-ol permet de s'affranchir de l'eau grâce à la possibilité de remplacer la phase externe par un solvant ou du moins, limiter la diffusion du principe actif, par ajout d'un électrolyte dans la phase externe ou par mélange d'eau et d'un solvant.

#### b) Essais de coacervation avec le PLAGA 75 : 25 (Resomer® RG 756)

25

Les solvants dans lesquels le PLAGA 75 : 25 est soluble sont l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'acétonitrile, l'acide acétique, le diméthylacétamide, le diméthylformamide, l'éther diéthylique, la méthyléthylcétone, et la N-méthylpyrrolidone.

Le PLAGA 75 : 25 est insoluble dans le toluène, le propan-2-ol, le glycérol, le propane-1,2-diol, le propylène carbonate, le dioctyladipate et le triéthylcitrate.

Les deux solvants donnant les meilleurs résultats sont l'acide acétique et l'acétate d'éthyle. Les études se sont donc focalisées sur l'évaluation des

associations acide acétique/glycérol et acide acétique/propane-1,2-diol ainsi que les couples acétate d'éthyle/propan-2-ol et acétate d'éthyle/propane-1,2-diol.

Les associations pour lesquelles on observe la formation de microsphères individualisées sont :

- 5 - acétate d'éthyle/propane-1,2-diol/eau + Tween® 80 ou propan-2-ol,
- acide acétique/glycérol ou propane-1,2-diol/eau + Tween® 80.

**c) Essais de coacervation avec le PLAGA 85 : 15 (Resomer® RG 858)**

10 Les solvants dans lesquels le PLAGA 85 : 15 est soluble sont l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'acétonitrile, l'acide acétique, la diméthylformamide, l'éthanolamine, l'éthylènediamine, la méthyléthylcétone, la N-méthylpyrrolidone, le toluène et le triéthylcitrate. Le PLAGA 85 : 15 est insoluble dans le propan-2-ol, le glycérol, le propane-1,2-diol, le dioctyladipate et le xylène.

15 Les associations pour lesquelles on observe la formation de coacervat et de microsphères sont :

- acétate d'éthyle/propan-2-ol ou propane-1,2-diol/eau + Tween® 80,
- acétate d'éthyle/propan-2-ol/propane-1,2-diol,
- acétate d'éthyle/propane-1,2-diol/propan-2-ol,
- 20 - acide acétique/glycérol (eau + Tween® 80) ou propane-1,2-diol ou propan-2-ol,
- acide acétique ou méthyléthylcétone/propane-1,2-diol/eau + Tween® 80,
- acide acétique/propan-2-ol/propane-1,2-diol,
- N-méthylpyrrolidone ou méthyléthylcétone/propan-2-ol/eau + Tween® 80,
- 25 - méthyléthylcétone/propane-1,2-diol/propan-2-ol.

**Exemple 2 : Réalisation de microsphères non chargées en principe actif en faisant varier les paramètres de la coacervation.**

30 Dans un premier temps les conditions opératoires sont établies pour la préparation de microsphères sans principe actif, afin de réaliser des particules de la taille désirée. L'influence de différents facteurs comme le volume d'agent de coacervation ajouté, le volume de durcisseur, le type et la vitesse d'agitation, et la méthode de collecte des microsphères est étudiée.

Le polymère est dissous dans 50 ml de solvant organique (Bécher n° 1) pour donner une solution à 1 % (p/v). La concentration en polymère est portée à 4 % (p/v) quand le solvant est la N-méthylpyrrolidone. Sous agitation, on ajoute l'agent de coacervation jusqu'à l'obtention d'un coacervat stable et visible. Puis le  
5 mélange est versé dans une solution de durcisseur additionnée d'un tensioactif (Bécher n° 2), sous agitation. Les microsphères sont ensuite récupérées par filtration. Les associations testées sont celles sélectionnées dans l'exemple 1.

a) avec le PLAGA 50 : 50 (Resomer® RG 502).

10

Les différents protocoles correspondant à chacune des associations retenues sont récapitulés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Modes opératoires définis pour les formulations de microsphères non chargées en principe actif à base de PLAGA 50 : 50								
Associations Solvant/non-solvant (avec eau + tensioactif comme durcisseur)	Volume de non-solvant	Agitation Bécher 1	Vitesse Bécher 1	Agitation Bécher 2	Vitesse Bécher 2	Volume de durcisseur	Méthode de filtration	Taille des micro- sphères
Acétate d'éthyle/ propan-2-ol	9 ml	Magnétique	500 t/min	magnétique	700 t/min	750 ml	Filtre plissé	40 µm
Acide acétique/ Propane-1,2-diol	16 ml	Ultrasons		magnétique	1100 t/min	250 ml	Filtre plissé	24 µm
Acide acétique/ propan-2-ol	16 ml	Ultrasons		magnétique	1400 t/min	250 ml	Filtre plissé	67 µm
N-méthylpyrrolidone/ Ethanol	31 ml	Mécanique	200 t/min	magnétique	1000 t/min	1000 ml	Centrifuga- tion	31 µm
N-méthylpyrrolidone/ propan-2-ol	40 ml	Magnétique	300 t/min	magnétique	1000 t/min	500 ml	Filtre plissé	70 µm

**b) Application au PLAGA 75 : 25 (Resomer® RG 756).**

Des microsphères sont obtenues dans les conditions décrites dans le tableau 2 avec l'acétate d'éthyle comme solvant. Apparaissent trois possibilités  
5 d'agitation pour l'association acétate d'éthyle/propane-1,2- diol/eau + Montanox®  
80 ou Tween® 80 : l'agitation par les ultrasons, l'agitation mécanique à pales et l'agitation magnétique. Il n'y a pas de différences notables dans la morphologie ou la taille des microsphères qui puissent justifier le choix de l'une de ces méthodes.

TABLEAU 2

Modes opératoires définis pour les formulations de microsphères non chargées en principe actif à base de PLAGA 75 : 25								
Associations Solvant/non-solvant (avec eau + tensioactif comme durcisseur)	Volume de non-solvant	Agitation Bécher 1	Vitesse bécher 1	Agitation Bécher 2	Vitesse Bécher 2	Volume de durcisseur	Méthode de filtration	Taille des micro- sphères
Acétate d'éthyle/ Propane-1,2-diol	15 ml	ultrasons		magnétique	1100 t/min	750 ml	Filtre plissé	20 µm
Acétate d'éthyle/ Propane-1,2-diol	15 ml	mécanique	400 t/min	magnétique	1100 t/min	750 ml	Filtre plissé	25 µm
Acétate d'éthyle/ propan-2-ol	16 ml	magnétique	900 t/min	magnétique	1100 t/min	800 ml	Filtre plissé	32 µm

**Exemple 3 : Réalisation de microsphères chargées en 5-fluorouracile (5-FU) comme principe actif.**

Les essais sont réalisés avec les associations de l'exemple 1 a) et b) qui  
5 ont conduit à l'observation d'un coacervat.

**a) Influence du principe actif sur la coacervation.**

Le principe actif à faible concentration (5 % en poids) forme avec la  
10 solution de polymère une dispersion homogène. La stabilité de la dispersion dépend des solvants ; ainsi la N-méthylpyrrolidone, qui est un solvant visqueux, conduit à une meilleure stabilité de la dispersion et les pertes en antimitotique par décantation ou adsorption sur les parois des béchers sont diminuées.

L'emploi de propane-1,2-diol comme agent de coacervation stabilise  
15 davantage le système en augmentant la viscosité du milieu.

**b) Rendement de production.**

Il varie de 15 à 100 % suivant les associations. Les associations utilisant  
20 l'acétate d'éthyle comme solvant du polymère donnent les meilleurs rendements, proches de 100 %.

**c) Taux et rendement d'encapsulation.**

25 Lorsque l'on augmente les charges théoriques en principe actif, le rendement d'encapsulation est très faible.

Un passage aux ultrasons permet d'individualiser les particules de principe actif. Lorsque l'on travaille avec de faibles concentrations, la dispersion est homogène et on atteint des rendements d'encapsulation de 70 %.

30

**Exemple 4 : Etude de l'association N-méthylpyrrolidone/éthanol/eau + tensioactif.**

Parmi les polymères testés solubles dans la N-méthylpyrrolidone, on  
35 retiendra :

- Résomer<sup>®</sup> RG 502 (Boehringer Ingelheim), qui est un D,L-PLAGA 50 :50,
- Résomer<sup>®</sup> RG 756 (Boehringer Ingelheim) et Phusiline (Saint-Ismier) qui sont des D,L-PLAGA 75 : 25,

La formulation initiale des microparticules utilise une solution organique de polymère à 4 ou 10 % (p/v) pour un volume de solvant de 5 ml. La coacervation est réalisée sous agitation magnétique. Le non-solvant du polymère est ajouté à l'aide d'une micropipette, ml par ml. Dès l'apparition d'un trouble de la solution, un échantillon est prélevé et observé en microscopie optique. Une minute après l'apparition du trouble, le milieu de coacervation est versé goutte à goutte dans 200 ml de durcisseur (eau + Tween<sup>®</sup> 80 ou PVA). Le durcissement des microparticules est réalisé sous agitation mécanique. Une nouvelle observation en microscopie optique des microparticules est effectuée pendant le durcissement. Puis les microparticules sont filtrées sous vide, ou à pression atmosphérique sur papier filtre en cas d'impossibilité de filtration sous vide (colmatage quasi-immédiat du filtre ou durée de filtration trop importante). Enfin, les microparticules sont observées juste après filtration et après lyophilisation.

Les microparticules obtenues avec l'association NMP/éthanol/eau + tensioactif sont, en microscopie optique, sphériques, lisses et régulières, quel que soit le stade de la formulation et quel que soit le type de polymère.

Pour tous les lots réalisés, la filtration après durcissement a été réalisée sur papier filtre et à pression atmosphérique. La taille des microparticules est comprise entre 30 et 50  $\mu\text{m}$ . De nombreuses microparticules d'environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre sont aussi observées.

#### • Influence du type de polymère et de sa concentration.

Les microparticules obtenues présentent toutes le même aspect en microscopie optique.

Les meilleurs rendements sont obtenus avec Résomer<sup>®</sup> RG 502 et Résomer<sup>®</sup> RG 756 dans les conditions suivantes (tableau 3).

TABLEAU 3

Type de polymère	Concentration du polymère (p/v)	Type de durcisseur	Concentration du tensioactif dans le durcisseur (v/v)	Temps de durcissement	Température pendant la coacervation	Température pendant le durcissement	Rendement de fabrication
RG 502	10 %	PVA	0,5 %	3 h 30	ambiante	ambiante	23,8 %
RG 502	10 %	Tween® 80	1 %	3 h 30	ambiante	< 4°C	35,9 %
RG 756	4 %	Tween® 80	1 %	2 h	ambiante	ambiante	49,0 %
RG 756	4 %	Tween® 80	5 %	2 h	ambiante	ambiante	38,6 %

- **Influence de la nature du durcisseur et du temps de durcissement.**

Le type de durcisseur (eau, eau + Tween® 80, ou eau + PVA), pour le même polymère PLAGA 50 : 50 (RG 502) et à température ambiante, n'influe ni sur la filtration ni sur le rendement de fabrication des microparticules qui reste compris entre 17,5 et 23,8 %.

Le temps de durcissement, pour le même polymère PLAGA 50 : 50 (RG 502), permet d'augmenter le rendement de fabrication d'environ 10 %, à température ambiante.

- **Influence de la température**

- a) Pendant le durcissement

Un durcissement à une température inférieure à 4°C a permis de doubler le rendement de fabrication des microparticules, pour le PLAGA 50 : 50 (RG 502) : 35,9 contre 17,5 %.

- b) Pendant la coacervation

Les manipulations réalisées entièrement à une température inférieure à 4°C ont un rendement de fabrication de 10,5 % maximum.

L'association N-méthylpyrrolidone/éthanol/eau + tensioactif conduit à la formation de microparticules présentant un aspect satisfaisant en microscopie optique.

**Exemple 5 : Microsphères chargées avec la progestérone ou le budésonide.**

La progestérone et le budésonide sont des principes actifs hydrophobes solubles dans l'acétate d'éthyle.

On utilise l'association acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau + Tween® 80, et le D,L-PLAGA 75 : 25 (Phusis, Saint-Ismier) comme polymère.

Les rendements de fabrication sont tous supérieurs à 90 %.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Lot	Conc. polymère (p/v) et masse PA	Coacervation			Durcisseur					Rendement de fabrication	Granulométrie (µm)
		Mode d'ajout du non-solvant	Température	Agitation	Type	Conc. TA	Volume	Température	Durée	Agitation	
1	4 % progestérone 28,5 mg (solution)	200/200µl 1 min entre chaque ajout	-4°C	Méca. 300 t/min	Tween® 80	10 %	300 ml +150 ml +150 ml (filtr.) +300 ml	0,5 °C	1 h +30 min + 1 h (filtr.) + 30 min	Méca. 500t/min	28,0 ± 12,5
2	4 % progestérone 30,1 mg (solution)	200/200µl 1 min entre chaque ajout	-4°C	Méca. 300 t/min	Tween® 80	10 %	300 ml +150 ml +150 ml (filtr.) +300 ml	0,5 °C	1 h +30 min + 1 h (filtr.) + 30 min	Méca. 500t/min	25,3 ±9,2
3	4 % budésouide 30,8 mg (solution)	200/200µl 1 min entre chaque ajout	-4°C	Méca. 300 t/min	Tween® 80	10 %	300 ml +150 ml +150 ml (filtr.) +300 ml	0,5 °C	1 h +30 min + 1 h (filtr.) + 30 min	Méca. 500t/min	20,8 ±8,7
4	4 % budésouide 29,8 mg (solution)	200/200µl 1 min entre chaque ajout	-4°C	Méca. 300 t/min	Tween® 80	10 %	300 ml +150 ml +150 ml (filtr.) +300 ml	0,5 °C	1 h +30 min + 1 h (filtr.) + 30 min	Méca. 500t/min	22,5 ±9,4

\* filtration sous vide, filtre Nylon.

Les taux et rendements d'encapsulation des principes actifs figurent dans le tableau suivant et sont calculés comme suit :

- Tthéo. =  $[\text{poids de principe actif} / (\text{poids de polymère} + \text{poids de principe actif})] \times 100$ ,

5 - Texp. =  $[\text{poids de principe actif} / \text{poids de microparticules sèches}] \times 100$ ,

Ils permettent de calculer le rendement d'encapsulation R :

-  $R = [T_{\text{exp.}} / T_{\text{théo.}}] \times 100$

Taux et rendements d'encapsulation de la progestérone et du budésone avec le PLAGA 75 : 25 (Phusis)				
Lot	Taux Théorique	Taux expérimental	Rendement d'encapsu- lation	Taux d'humidité résiduelle
1 (progestérone)	12,4 %	8,2 %	66,1 %	11,9 %
2 (progestérone)	13,1 %	9,5 %	72,5 %	—
3 (budésone)	13,3 %	8,0 %	60,1 %	—
4 (budésone)	13,0 %	8,8 %	67,7 %	16,4 %

- 10 L'association acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau + tensioactif conduit à la formation de microparticules présentant un aspect satisfaisant en microscopie optique. En revanche, les microparticules obtenues avec ce couple solvant/non-solvant sont plus fragiles et sont séchées à l'air libre, donc à température ambiante et à pression atmosphérique, pour ne pas être agglomérées de façon irréversible. Les
- 15 rendements de fabrication sont proches de 100 %. L'aggrégation est le principal problème rencontré avec cette association solvant/non-solvant/durcisseur. Elle peut être réduite en jouant sur différents paramètres de la formulation. La température à laquelle est effectuée la coacervation est notamment un facteur essentiel : abaissée à  $-4^{\circ}\text{C}$ , elle permet de figer le polymère et de rigidifier les
- 20 microparticules qui, ainsi, s'individualisent et ne se collent plus entre elles.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de microencapsulation d'un principe actif par coacervation qui  
5 consiste en
  - la désolvatation ménagée ou coacervation d'un polymère dissous dans un solvant organique contenant ledit principe actif, ladite coacervation étant induite par addition d'un non-solvant et se traduisant par le dépôt du polymère à la surface du principe actif, puis
  - 10 - le durcissement du dépôt de polymère par ajout d'un agent durcisseur, ledit durcissement se traduisant par la formation d'un film continu enrobant le principe actif,caractérisé en ce que
  - le solvant du polymère est un solvant organique non chloré de point d'ébullition compris entre 30°C et 240 °C et de permittivité diélectrique relative et comprise  
15 entre 4 et 60, avantageusement choisi parmi l'acétate d'éthyle, la N-méthylpyrrolidone, la méthyléthylcétone, l'acide acétique, le propylène carbonate et leurs mélanges,
  - le non-solvant est un alcool ou une cétone comprenant 2 à 5 atomes, et  
20 préférentiellement 2 ou 3 atomes de carbone, en particulier l'éthanol ( $\epsilon=24$ ), le propan-2-ol ( $\epsilon=18$ ), le propane-1,2-diol ( $\epsilon$  entre 18 et 24) et le glycérol ( $\epsilon=40$ ), ou la méthyléthylcétone ( $\epsilon=18$ ),
  - l'agent durcisseur est choisi parmi l'eau, les alcools comprenant 1 à 4 atomes de carbone à condition que l'agent durcisseur soit un alcool différent du non-  
25 solvant, et leurs mélanges.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le non-solvant et le durcisseur sont respectivement choisis parmi les couples suivants : propane-1,2-diol et propan-2-ol, glycérol et propane-1,2-diol, glycérol et propan-2-ol,  
30 propan-2-ol et propane-1,2-diol.
3. Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le polymère est un polymère biodégradable dont la masse moléculaire en poids (Mw) est comprise entre 10 000 et 90 000 g/mole, de préférence entre 15 000 et 50

000 g/mole, dont l'indice de polydispersité (Ip) est compris entre 1 et 3,5, de préférence entre 1,5 et 2,5.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le polymère est un polymère d'acide lactique (PLA) ou un polymère d'acides lactique et glycolique (PLAGA).
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le polymère est un PLAGA tel que Mw est comprise entre 15 000 et 25 000, de préférence égal à 17 500, Ip est compris entre 1 et 2, de préférence égal à 1,6, et le pourcentage d'acide glycolique est inférieur à 30%, de préférence égal à 25%.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la concentration en polymère dans le solvant est comprise entre 1 et 10% (p/v), de préférence de l'ordre de 4% (p/v).
7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le rapport volumique non-solvant/solvant est compris entre 1/2 et 1/1.
8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la température de coacervation est inférieure à la température de transition vitreuse du polymère, de préférence inférieure ou égale à 25°C, de préférence inférieure à 4°C, de préférence encore égale à -4°C.
9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent durcisseur contient en outre un agent tensioactif, la concentration dudit agent tensioactif dans l'agent durcisseur étant comprise entre 0,1 et 10% (v/v).
10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'agent tensioactif est un ester de sorbitane, par exemple le Tween<sup>®</sup> 80, ou l'alcool polyvinylique.

11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le rapport volumique agent durcisseur/solvant est compris entre 5/1 et 180/1, et de préférence entre 15/1 et 120/1.
- 5 12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le durcissement des microsphères est réalisé sous agitation à une vitesse comprise entre 500 et 1500 t/min.
- 10 13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la température de durcissement est inférieure ou égale à 25°C, de préférence inférieure à 4°C, de préférence encore inférieure ou égale à 0,5°C.
- 15 14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lorsque le principe actif forme une dispersion dans la solution de polymère, le solvant et le non-solvant ont une viscosité suffisamment élevée pour stabiliser le principe actif.
- 
- 20 15. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le principe actif est dispersé sous ultra-sons pour former une dispersion dans la solution de polymère, et la coacervation est réalisée sous agitation douce, de préférence de type magnétique ou mécanique.
- 25 16. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la granulométrie du principe actif est comprise entre 1 et 50 micromètres, et préférentiellement entre 5 µm et 30 µm.
17. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le solvant est la N-méthylpyrrolidone, le non-solvant est l'éthanol, et le durcisseur est l'eau.
- 30 18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le solvant est l'acétate d'éthyle.
19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que le solvant est l'acétate d'éthyle, le non-solvant est le propan-2-ol, et le durcisseur est l'eau.

20. Procédé selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que le polymère est un PLAGA 75 :25 tel que Mw est comprise entre 15 000 et 20 000, de préférence égal à 17 500, Ip est compris entre 1 et 2, de préférence égal à 1,6.

5

21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le solvant est l'acide acétique, le durcisseur est l'eau, et le polymère est un PLAGA 50 : 50.

10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal Application No

PCT/FR 00/02376

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01J13/08 A61K9/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THOMASIN C ET AL: "DRUG MICROENCAPSULATION BY PLA/PLGA COACERVATION IN THE LIGHT OF THERMODYNAMICS. 1. OVERVIEW AND THEORETICAL CONSIDERATIONS" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, US, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. WASHINGTON, vol. 87, no. 3, 1 March 1998 (1998-03-01), pages 259-268, XP000736341 ISSN: 0022-3549 table 1	1
A	WO 97 41837 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV ;ALKERMES INC (US)) 13 November 1997 (1997-11-13) example 1 --- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 2000

Date of mailing of the international search report

13/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Shade, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/FR 00/02376

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 13799 A (MEDISORB TECHNOLOGIES INTERNAT) 26 May 1995 (1995-05-26) page 9, line 14 -page 11, line 12 ---	1
A	EP 0 330 180 A (BIOMATERIALS UNIVERSE INC) 30 August 1989 (1989-08-30) claims 5-9 ---	1
A	US 5 324 520 A (DUNN RICHARD L ET AL) 28 June 1994 (1994-06-28) example 1 -----	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02376

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9741837 A	13-11-1997	AU 2897297 A	26-11-1997
		BG 102854 A	31-05-1999
		BR 9709217 A	10-08-1999
		CA 2251987 A	13-11-1997
		CN 1226821 A	25-08-1999
		CZ 9803591 A	17-03-1999
		EP 0904063 A	31-03-1999
		JP 2000503663 T	28-03-2000
		NO 984808 A	06-01-1999
		PL 329720 A	12-04-1999
		SK 154198 A	07-05-1999
		US 5916598 A	29-06-1999
		US 6110503 A	29-08-2000
		US 5792477 A	11-08-1998
WO 9513799 A	26-05-1995	AU 684324 B	11-12-1997
		AU 1101095 A	06-06-1995
		AU 697887 B	22-10-1998
		AU 3683197 A	20-11-1997
		CA 2176716 A	26-05-1995
		EP 0729353 A	04-09-1996
		EP 0998917 A	10-05-2000
		JP 9505308 T	27-05-1997
		US 5654008 A	05-08-1997
		US 5650173 A	22-07-1997
EP 0330180 A	30-08-1989	JP 1216918 A	30-08-1989
		JP 2670680 B	29-10-1997
		DE 68904326 D	25-02-1993
		DE 68904326 T	15-07-1999
		US 5100669 A	31-03-1992
US 5324520 A	28-06-1994	AU 2561492 A	16-03-1993
		WO 9303669 A	04-03-1993

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No

PCT/FR 00/02376

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 B01J13/08 A61K9/50

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 B01J A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	THOMASIN C ET AL: "DRUG MICROENCAPSULATION BY PLA/PLGA COACERVATION IN THE LIGHT OF THERMODYNAMICS. 1. OVERVIEW AND THEORETICAL CONSIDERATIONS" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, US, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. WASHINGTON, vol. 87, no. 3, 1 mars 1998 (1998-03-01), pages 259-268, XP000736341 ISSN: 0022-3549 tableau 1	1
A	WO 97 41837 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV ;ALKERMES INC (US)) 13 novembre 1997 (1997-11-13) exemple 1 --- -/--	1



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*G\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Shade, M

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den e Internationale No

PCT/FR 00/02376

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 13799 A (MEDISORB TECHNOLOGIES INTERNAT) 26 mai 1995 (1995-05-26) page 9, ligne 14 -page 11, ligne 12 ---	1
A	EP 0 330 180 A (BIOMATERIALS UNIVERSE INC) 30 août 1989 (1989-08-30) revendications 5-9 ---	1
A	US 5 324 520 A (DUNN RICHARD L ET AL) 28 juin 1994 (1994-06-28) exemple 1 -----	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. : Internationale No

PCT/FR 00/02376

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9741837 A	13-11-1997	AU 2897297 A	26-11-1997
		BG 102854 A	31-05-1999
		BR 9709217 A	10-08-1999
		CA 2251987 A	13-11-1997
		CN 1226821 A	25-08-1999
		CZ 9803591 A	17-03-1999
		EP 0904063 A	31-03-1999
		JP 2000503663 T	28-03-2000
		NO 984808 A	06-01-1999
		PL 329720 A	12-04-1999
		SK 154198 A	07-05-1999
		US 5916598 A	29-06-1999
		US 6110503 A	29-08-2000
		US 5792477 A	11-08-1998
WO 9513799 A	26-05-1995	AU 684324 B	11-12-1997
		AU 1101095 A	06-06-1995
		AU 697887 B	22-10-1998
		AU 3683197 A	20-11-1997
		CA 2176716 A	26-05-1995
		EP 0729353 A	04-09-1996
		EP 0998917 A	10-05-2000
		JP 9505308 T	27-05-1997
		US 5654008 A	05-08-1997
		US 5650173 A	22-07-1997
EP 0330180 A	30-08-1989	JP 1216918 A	30-08-1989
		JP 2670680 B	29-10-1997
		DE 68904326 D	25-02-1993
		DE 68904326 T	15-07-1999
		US 5100669 A	31-03-1992
US 5324520 A	28-06-1994	AU 2561492 A	16-03-1993
		WO 9303669 A	04-03-1993